

ردیابی جهش در اگزون‌های ۳، ۱۰ و ۱۲ ژن BRCA1 در ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان فامیلی

حسین تیموری*، دکتر پروین مهدی‌پور**، دکتر مرتضی عطری***، محمدرضا میرزایی****

چکیده

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین علل مرگ در میان زنان مبتلا به سرطان می‌باشد. بیش از نیمی از خانواده‌های دارای سرطان پستان فامیلی در زن مستعدکننده به سرطان، معروف به BRCA1 جهش نشان می‌دهند. در این مطالعه نمونه خون ۳۰ زن مبتلا به سرطان پستان که سابقه فامیلی در بروز بیماری داشتند، مورد بررسی قرار گرفت. روش غیررادیواکتیو PCR-SSCP به منظور تشخیص جهش‌زایی در اگزون‌های ۳، ۱۰ و ۱۲ ژن BRCA1 مورد استفاده واقع شد که منجر به شناسایی دو جهش در اگزون ۳ و دو جهش در اگزون ۱۲ گردید. در اگزون ۱۰ جهشی شناسایی نشد. تجزیه و تحلیل آماری به دلیل تعداد کم جهش شناسایی شده، بین وجود جهش و مشخصات آسیب‌شناختی رابطه معنی‌داری نشان نداد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد این سه اگزون کمتر دچار جهش‌زایی می‌شوند. با بررسی مطالعات مشابه در دیگر کشورها و همخوانی نتایج این مطالعه با آنها، می‌توان نتیجه گرفت که جهش در اگزون‌های ۳، ۱۰ و ۱۲ کمتر اتفاق می‌افتد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، جهش، BRCA1، SSCP

*- عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان - نشانی: دانشکده پزشکی گرگان، تلفن: ۰۷۱-۲۲۳۱۶۵۵-۶

** - عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه ژنتیک انسانی *** - عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی - استیون کانسر

**** - عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

مقدمه

سرطان پستان شایع ترین نوع سرطان در زنان می باشد. تقریباً ۱۰ درصد زنان به درجات مختلفی از سرطان پستان، دچار می شوند. سرطان پستان را از نظر استعداد ژنتیکی به سه دسته سرطان پستان تک‌گیر، فامیلی و ارثی تقسیم می کنند. مواردی از سرطان راکه خویشاوندان درجه یک و دو فرد شاخص^۱ مبتلا می شوند و از تعریف سرطان پستان ارثی تبعیت نمی کنند، در دسته سرطان پستان فامیلی قرار می دهند. ۲۳ درصد مبتلایان در این دسته قرار می گیرند (۱).

دو ژن BRCA1^۲ و BRCA2^۳ مهم ترین ژن های دخیل در سرطان پستان می باشند (۲). جهش در ژن BRCA1 در ۵۰ درصد موارد سرطان پستان فامیلی مشاهده می شود. این رقم در مبتلایان به سرطان پستان ارثی^۴ به ۸۵ درصد می رسد. از این روژن BRCA1 به عنوان ژن مستعد کننده یا پیش آمادگی سرطان پستان ارثی به حساب می آید (۳).

BRCA1 یک ژن سرکوبگر توده^۵ می باشد. این ژن در جایگاه ۱۷q۲۱ قرار گرفته، طولی برابر ۱۰۰ کیلوباز داراست و شامل ۲۲ اگزون کدکننده و ۱۲ اگزون غیرکدکننده (اگزون های ۱ و ۲۴) می باشد (۴). عملکرد آن هنوز کاملاً مشخص نیست ولی در مقالات مختلف دخالت در ترمیم DNA (۵)، تنظیم چرخه سلولی (۶)، تمایز و تکامل جنین (۷) و عامل نسخه برداری (۸) به آن نسبت می دهند.

از میان اگزون های کدکننده، اگزون ۱۱ با طولی برابر ۳/۴ کیلوباز بخش اعظم ژن را شامل می شود و بخش های راهبردی پروتئین مانند NLS^۶، محل اتصال RAD51^۷ و گرانین را در خود جای داده است. اگزون ۳ حدود ۳۱۵ (bp) جفت باز طول دارد و در ساختمان RF^۷ شرکت می کند. اگزون ۱۰ با طولی برابر ۲۲۰ (bp) جفت باز در ناحیه مجاور NLS قرار دارد. اگزون ۱۲ نیز بعد از ناحیه اتصال RAD51 قرار گرفته و حدود ۲۲۰ (bp) جفت باز طول دارد (۹).

در این مطالعه ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان فامیلی^۸ به منظور تشخیص جهش زایشی در اگزون های ۳، ۱۰ و ۱۲ به روش

غیررادبواکتیو SSCP^۹ - PCR^{۱۰} مورد بررسی قرار گرفتند.

وسایل و روش ها

افراد مورد بررسی زنان بستری در بخش سرطان بیمارستان امام خمینی و بیمارستان دی تهران بودند که برای معالجه سرطان پستان مورد جراحی قرار گرفتند. ابتدا بیماران به وسیله متخصص ژنتیک مشاوره، و سپس از میان آنها ۳۰ بیمار که سابقه عود بیماری در خویشاوندان درجه یک و دو داشتند، انتخاب شدند. مشخصات آسیب شناختی بیماران از پرونده های آنها استخراج گردید. نمونه های خون آنها در لوله های حاوی EDTA به آزمایشگاه انتقال یافت و به روش ایزوپروپانل استخراج DNA آنها صورت گرفت. DNA خالص در بافر TE در دمای ۴°C نگهداری گردید. اگزون های ۳، ۱۰ و ۱۲ افراد مورد مطالعه با روش PCR (۲۵ سیکل، ۹۴°C یک دقیقه، ۵۶°C چهل و پنج ثانیه و ۷۲°C سی ثانیه) تکثیر شدند. جدول ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده راکه آژانس بین المللی سرطان (IARC)^{۱۱} در اختیار مجریان طرح قرار داده بود، نشان می دهد.

محصولات PCR به منظور تایید واکنش، روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و سپس نمونه ها برای تشخیص جهش با تکنیک SSCP تجزیه و تحلیل شدند. ماتریکس ژل SSCP پلی اکریل آمید و دیریک مورد MDE بود و از رنگ آمیزی نقره^{۱۲} برای رنگ آمیزی ژل کمک گرفته شد. TBE به عنوان بافر الکتروفورز استفاده گردید و هر ژل با ولتاژ ۷۰ به مدت ۲۰ ساعت الکتروفورز شد. تست دقیق فیشر (Fisher exact test) برای تحلیل داده ها بکار گرفته شد.

- | | |
|---|----------------------------|
| 1 - Proband | 2 - Breast cancer 1 |
| 3 - Breast cancer 2 | |
| 4 - Hereditary Breast Cancer | |
| 5 - Tumour Suppressor Gene | |
| 6 - Nuclear Localization Sequences (NLS) | |
| 7 - Ring Finger (RF) | 8 - Familial Breast Cancer |
| 9 - Single Stranded Conformation Polymorphism | |
| 10 - Polymerase Chain Reaction | |
| 11 - International Agency for Research on Cancer (IARC) | |
| 12 - Silver staining | |

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای اگزون ۳، ۱۰ و ۱۲

Gene	Exon	Primer	Sequence
BRCA1	3	Forward	5'TCCTGACACAGCAGACATTTA-3
		Reverse	5'TTGGACTTTTCGTTCTCACTTA3
	10	Forward	5'TGGTCAGCTTTCTGTAATCG-3
		Reverse	5'TATCTACCCACTCTCTTCTTCAG-3
	12	Forward	5'GTCCTGCCAATGAGAAGAAA-3
		Reverse	5'TGTCAGCAAACCTAAGAATGT-3

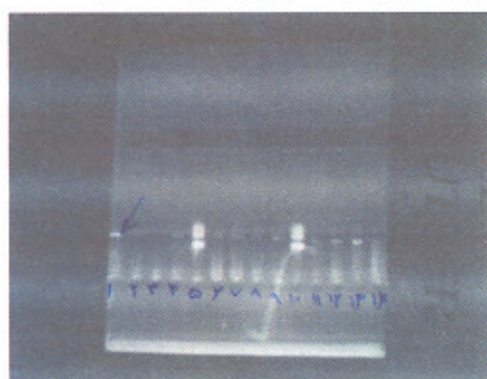
جدول ۲. توزیع فراوانی سن، محل توده، درگیری غددلنفوی و وضعیت گیرنده استروژن در ۳۰ بیمار مورد بررسی

سن		محل توده		درگیری غددلنفوی		وضعیت گیرنده استروژن		نامعلوم	فراوانی
≤۳۵	>۳۵	راست	چپ	مثبت	منفی	مثبت	منفی		
۷	۲۳	۱۳	۱۷	۱۵	۱۵	۱۶	۶	۸	فراوانی نسبی (درصد)
۲۳/۳	۷۶/۶	۴۳/۳	۵۶/۷	۵۰	۵۰	۵۳/۳	۲۰	۲۶/۶	

یافته‌ها

در پایان کار به کمک آزمایش SSCP، دو جهش در اگزون ۳

و دو جهش در اگزون ۱۲ شناسایی شد که جدول ۴ مشخصات آسیب‌شناختی بیماران دارای جهش را نشان می‌دهد.



شکل ۱. عکس از ژل آگارز که در آن نمونه‌ها از ۱ تا ۱۳ بارگذاری شده‌اند. ستون‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ محصولات PCR مربوط به اگزون ۳ می‌باشند. ستون ۵ و ۱۰ نشانگر ۱۷ است. ستون‌های ۶، ۷، ۸ و ۹ مربوط به اگزون ۱۰ و ستون‌های ۱۱، ۱۲ و ۱۳ مربوط به اگزون ۱۲ می‌باشند. ستون ۱۴ خالی است. در ستون ۳ باندهای مشاهده نمی‌شود که به دلیل صورت نگرفتن واکنش PCR می‌باشد و آزمایش دوباره باید تکرار شود. فلش در سمت چپ تصویر باید شاخص هر اگزون را نشان می‌دهد.

مشخصات آسیب‌شناختی ۳۰ زن مبتلا به سرطان پستان از پرونده‌های بیمارستانی استخراج شد. در همه بیماران یک پستان سرطانی شده بود. جدول ۲ و ۳ توزیع فراوانی سن، محل توده، درگیری غددلنفوی، وضعیت گیرنده استروژن، تشخیص آسیب‌شناسی و درجه تمایز توده را نشان می‌دهند.

از خون بیماران، DNA استخراج شد. آنگاه اگزون‌های ۳، ۱۰ و ۱۲ با روش PCR تکثیر شدند. محصولات PCR روی ژل آگارز الکتروفورز گردید. نمونه‌ای از ژل، آگارز در شکل ۱ نشان داده شده است.

برای تشخیص جهش، نمونه‌ها روی ژل SSCP الکتروفورز شدند. به منظور آشنایی با پروتکل SSCP به منبع ۱۱ مراجعه شود. شکل ۲ یک ژل SSCP رنگ آمیزی شده را نشان می‌دهد.

جدول ۳. توزیع فراوانی انواع تشخیص آسیب‌شناسی و درجه تمایز توده در بیماران مورد مطالعه

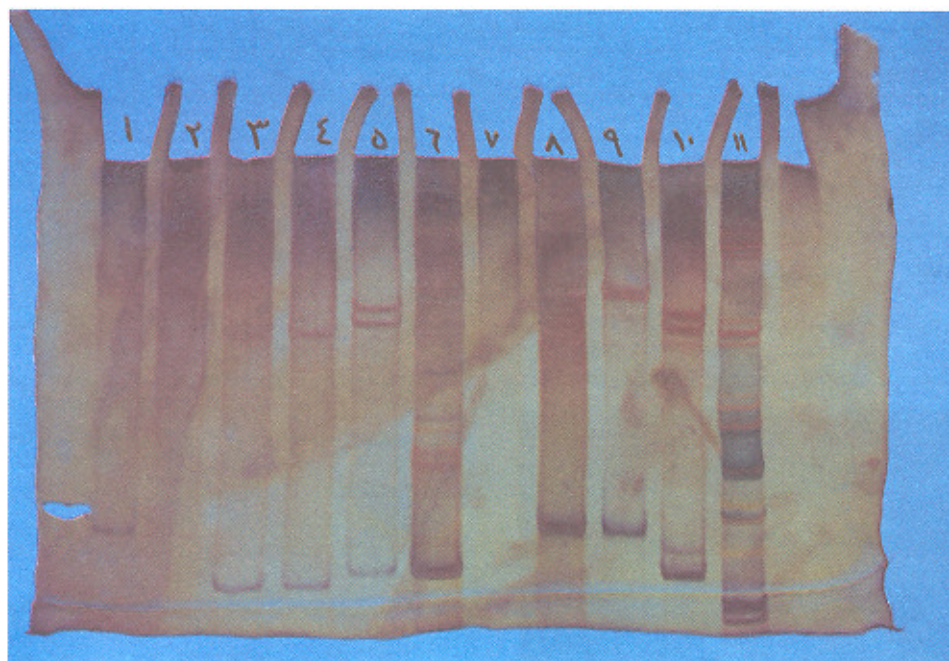
تشخیص آسیب‌شناسی						درجه تمایز توده				فراوانی
¹ Inv.DC	² Inf.DC	³ Inf.LC	⁴ Inv.PC	⁵ fibro	unkown	II	III	IV	unkown	
۱۴	۹	۲	۱	۱	۳	۴	۱۶	۱	۹	فراوانی
۴۶/۶	۳۰	۶/۶۷	۳/۳۳	۳/۳۳	۱۰	۱۳/۳	۵۳/۳	۳/۳۳	۳۰	فراوانی
										سی (درصد)

- 1- Invasive Ductal Carcinoma
- 2- Infiltrative Ductal Carcinoma
- 3-Infiltrative Lobular Carcinoma

- 4- Invasive Papillary Carcinoma
- 5- Fibroadenoma

جدول ۴. مشخصات آسیب‌شناختی بیماران دارای جهش در افراد مورد مطالعه به روش PCR-SSCP

سن	محل توده	اندازه توده سانتی متر	تشخیص آسیب‌شناسی	درجه تمایز توده	درگیری غدد لنفوی	وضعیت گیرنده استروژن	اگزون
۱۵	R	۹/۵	Inv.DC	?	+	+	۳
۷۵	L	۱	Inv.DC	?	-	-	۳
۱۵	R	۹/۵	Inv.DC	?	+	+	۱۲
۲۹	R	۲	Inf.LC	III	+	+	۱۲



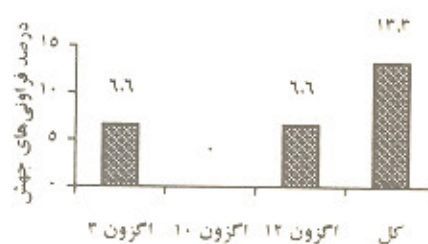
شکل ۲: نتایج حاصل از SSCP محصولات PCR چندین اگزون به منظور نشان دادن توانایی تمیز اگزون‌ها. ستون ۱ و ۱۲ اگزون سه، ستون ۳ و ۱۴ اگزون ۱۰، ستون ۵ و ۱۱ اگزون ۱۲، ستون ۶ اگزون ۱۱ و ستون ۷، خطای PCR را نشان می‌دهند. ستون ۸ و ۱۹ اگزون ۱۴ و ستون آخر نشانگر VIII می‌باشد.

تحلیل آماری فیشر هیچ رابطه معنی‌داری بین جهش‌ها و مشخصات آسیب‌شناختی در سطح ۰/۰۵ نشان نداد.

بحث

باید در نظر داشت که تعیین ارثی یا فامیلی بودن سرطان پستان از نظر بالینی بسیار مشکل است. به همین خاطر در بیشتر مطالعات پایه معمولاً تعدادی بیمار که در خانواده آنها سابقه ابتلا وجود دارد انتخاب کرده، آنها را از حیث جهش‌زایی مورد بررسی قرار می‌دهند (۱). مطالعه حاضر نیز بر همین پایه نمونه‌های خود را انتخاب نمود. این تشابه ما را قادر می‌سازد که نتایج به دست آمده از این مطالعه را با دیگر مطالعات به راحتی مقایسه کنیم.

نمودار ۱ مربوط به توزیع فراوانی جهش در سه اگزون به قرار زیر است.



نمودار ۱: نمایش توزیع فراوانی جهش در اگزون ۳، ۱۰ و ۱۲

در بیماران مبتلا به سرطان پستان اولیه

جدول ۵: جهش در اگزون‌های ۳ و ۱۰ و ۱۲ ژن BRCA1

Reference	Population	Frequency	Effect	Mutation type	Codon	Nucleotide	Exon
۱۲	Ashkenazi	1/50	Stop at 39	Frameshift	33	230delAA	3
۱۳	Japan	1/30	Polymorphism	Silent	-	23	3
۱۴	U.S.A	1/33	Polymorphism	Silent	38	233	3
۱۵	Ashkenazi	1/45	Polymorphism	Silent	38	233	3
۱۲	Ashkenazi	1/50	Exon 3 deleted	Slit Site	?	?	3
۱۶	Canada	1/32	Tyr→cys	Missense	42	"	3
۱۷	France	?	Stop at 49	Frameshift	49	243del	3
۱۵	Ashkenazi	1/45	?	Unknown	?	731	10
۱۰	Italy	1/35	delAG-ter	Frameshift	1374	4239	12
۱۸	German	1/27	delAG-ter	Frameshift	1389	4283	12
۱۴	U.S.A	1/33	C→T	Nonsense	1395	4302	12
۱۵	Ashkenazi	1/45	C→T	Nonsense	1395	4302	12
۱۹	England	?	C→T	Unknown	1396	4302	12
۱۳	Japan	1/30	Polymorphism	Missense	1421	4410	12

هرچند روش SSCP روشی آسان و ارزان قیمت برای غربالگری جهش می‌باشد و قادر است با ۹۵ درصد اطمینان جهش را تشخیص دهد، اما برای تعیین دقیق محل و نوع جهش با روش تعیین توالی^۱ مورد بررسی قرار گیرند.

جهش‌های متعددی در ژن BRCA1 شناسایی شده است. بیشترین جهش در اگزون ۱۱ گزارش شده است. اگزون‌های ۲، ۵، ۱۹، ۲۰ و ۲۱ به نسبت دیگر اگزون‌ها جهش‌های بیشتری نشان می‌دهند. ۸۱ درصد جهش‌ها از نوع بی‌معنی^۲ می‌باشند که خود نشان می‌دهد فقدان محصول ژن BRCA1 نقش بیشتری در سرطان زایی دارد (۱۳). جهش در اگزون‌های ۳، ۱۰ و ۱۲ به دلیل قرار نگرفتن این سه اگزون در مناطق نقاط داغ^۳ ژن کمتر گزارش شده است (۹).

بی‌معنی بودن نتایج آزمون‌های آماری انجام شده به دلیل نادر بودن جهش در سه اگزون مورد بررسی در این طرح می‌باشد. طبیعی است وقتی ۲ جهش در ۳۰ بیمار تشخیص داده شود هیچ رابطه‌ای با مشخصات آسیب‌شناختی نخواهد داشت.

جدول ۵ خلاصه‌ای از نتایج تحقیقاتی است که در دیگر

کشورها انجام شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در کشورهای ژاپن، آمریکا، کانادا، فرانسه، ایتالیا و انگلیس فراوانی جهش در اگزون‌های ۳ و ۱۲ بسیار پایین است. در جدول فقط یک جهش در اگزون ۱۰ گزارش شده است. از آن جاکه روی این سه اگزون در خانواده‌های ایرانی بررسی صورت نگرفته بود، نتایج این مطالعه نشان داد که در این گروه از آزمایش‌شوندگان، نیز مانند دیگر کشورهای فراوانی جهش در اگزون‌های ۳، ۱۰ و ۱۲ پایین می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از آقایان دکتر مرتضی هاشم‌زاده، دکتر سیروس عظیمی، سیدسعید حسینی اصل، مجید خیرالهی و رضا میرفرخایی به خاطر مساعدت و همکاری شایسته‌شان صمیمانه تشکر می‌گردد. از مسؤولان آزمایشگاه ژنتیک دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران و آژانس بین‌المللی سرطان فرانسه IARC نیز به خاطر همکاری‌هایشان متشکریم.

1 - Sequencing analysis 2 - Nonsense
3 - Hotspot

منابع

- 1- Kirby I. Bland, Edward M Copeland, Breast, Seymour I. Schwartz, G. Tom Shires, Frank C. Spencer, Principles of surgery, Chapter 14, vol 2, 7th Ed, New York, MC Graw Hill, 1999; p: 554-555.
- 2- Marco Van Der L., Csilla Szabo, Istran Beznyak, Gyorgy Liska, Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutation among breast and ovarian cancer. Int J Cancer. 2000; 8: 337-740.
- 3- James WE, Paterson A. A review of structure and putative functions of BRCA1. Disease Markers. 1998; 13 (2): 261-274.
- 4- Miki Y, Swensen J. A strong candidate for the breast and ovarian cancer. Science. 1994; 266: 66-71.
- 5- Bork P, Hofman K. A superfamily of conserved domains in DNA damage. Hum Molec Genet. 1995; 4: 2265-2273.
- 6- Chapman MS, Vema IM. Transcriptional activation by BRCA1. Nature. 1996; 382 (6593): 678-679.
- 7- Zabludoff SD, Wright WW. BRC1 mRNA is expressed highly during meiosis. Oncogene. 1996; 13 (3): 649-653.
- 8- Lewin B, Gene V. Fifth Ed. London, Oxford University Press. 1994; 887-891.
- 9- Startten MR, Wooster R. Hereditary predisposition to breast cancer. Am J Hum Genet. 1996; 13: 1031-1039.
- 10- Montagosa M, Santactterina M. Identification of seven new BRCA1 germline mutation. Cancer Research. 1996; 56: 5466-5469.
- 11- Hayashi K. PCR SSCP, Landegren ULF, Hayashi K. Laboratory protocols for mutation detection. First Ed, London, Oxford University Press. 1996; pp: 14-26.
- 12- Fredman LS, Szabo CI. Novel inherited mutations and variable expressivity of BRCA1 alleles. Am J Hum Genet. 1995; 57 (6): 1284-1297.
- 13- Fukutomi T, Ushijima T. Germline mutation of BRCA1 in Japanese. Cancer Res. 1995; 55 (16): 3521-3524.
- 14- Malone KE, Daling JR, Thompson JD. BRCA1 mutation and breast cancer in the general population. JAMA. 1998; 279 (12): 922-929.
- 15- Shattuck Eidens D, Diphant A, MC Clure M. BRCA1 sequence analysis in women at high risk. JAMA. 1997; 278 (15): 1242-1250.
- 16- Serova DM, Mazoyer Sylvie, Pufet N. Mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast cancer families. Am J Hum Genet. 1997; 60 (3): 486-495.
- 17- Stoppa-Lyonnet D, Laurent-Puig P, Essoux L. BRCA1 sequence variations in 160 individuals. Am J Genet. 1997; 60 (5): 1021-1030.
- 18- Juan Dony, Jenny C. A high proportion of mutations in the BRCA1 gene. Hum Genet. 1998; 103 (2): 154-161.
- 19- Eccels DM, Englefield P, Souby MA. BRCA1 mutations in Southern England. British J Cancer. 1998; 77: 2199-2203.